

Foto: Manuela Cristina Pessanha de Araujo Santiago



Determinação de Punicalagina em Romã (*Punica granatum* L.) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Manuela Cristina Pessanha de Araujo Santiago¹
Ronoel Luiz de Oliveira Godoy²
Renata Galhardo Borguini³
Diego Renan Sobreiro Falcão Paim⁴
Luis Filipe Cavalcanti Santos⁵
Viktor Christian Wilberg⁶
Regina Isabel Nogueira⁷
Suely Pereira Freitas⁸

Introdução

Os compostos fenólicos de origem natural são produtos do metabolismo secundário de vegetais e alguns, principalmente os presentes nas cascas dos frutos, têm como função a proteção da planta contra condições adversas e contribuem para as características de adstringência, cor e sabor e sua estabilidade oxidativa (NACZK; SHAHIDI, 2004). Tais compostos podem apresentar ainda propriedades antioxidantes, anti-inflamatória e hipocolesterolêmica, possuindo assim potencial para promover a saúde (GONÇALVES, 2008).

A cultura da romãzeira é de interesse de produtores da região semiárida do Brasil, devido às propriedades que a fruta apresenta quanto à elevada concentração de compostos fenólicos.

Investigações sobre os componentes químicos e sua atividade biológica em todas as partes da romã (*Punica granatum* L.), incluindo folhas, sementes, suco e casca, estão despertando o interesse tanto do ponto de vista de saúde como econômico (GIL et al., 2000; LANSKY; NEWMAN, 2007; SINGH et al., 2002; SUMNER et al., 2005).

A punicalagina (Figura 1) é um tanino hidrolisável (elagitanino), com atividades antioxidante e anti-inflamatória reconhecidas, se destacando como uma promissora molécula multifuncional (GONZÁLEZ-MOLINA et al., 2009). Na romã, ela se concentra em maior parte na casca e no mesocarpo do fruto (FISCHER et al., 2011).

¹ Engenheira Química, M.Sc. em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, manuela.santiago@embrapa.br

² Farmacêutico, D.Sc. em Química Orgânica, pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, ronoel.godoy@embrapa.br

³ Engenheira Agrônoma, D.Sc. em Saúde Pública, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, renata.borguini@embrapa.br

⁴ Graduando em Biotecnologia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, RJ, dieghh_186@hotmail.com

⁵ Graduando em Produção de Fármacos, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, RJ, luiscsantos92@gmail.com

⁶ Farmacêutico Bioquímico, D.Sc. em Engenharia de Alimentos, pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, viktor.wilberg@embrapa.br

⁷ Engenheira de Alimentos, D.Sc. em Engenharia Agrícola, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, regina.nogueira@embrapa.br

⁸ Engenheira Química, D.Sc. em Engenharia Nuclear e Planejamento Energético, professora adjunta da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, spfreitas@eq.ufrj.br

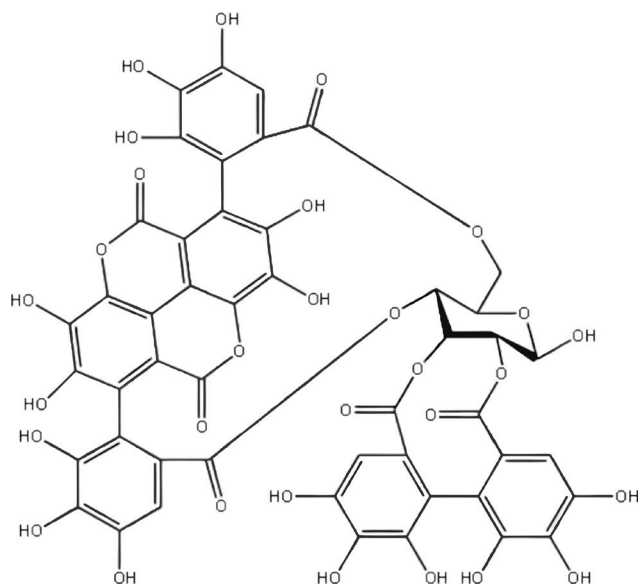


Figura 1. Estrutura da punicalagina.

O perfil de compostos fenólicos é distinto para diferentes frutas, podendo ainda variar de acordo com a cultivar analisada. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de fase reversa acoplada a um detector de arranjo de fotodiodos (DAD), por ser uma técnica instrumental de grande precisão, é uma ferramenta usada para a identificação e quantificação dos mesmos que, entretanto, pode necessitar de metodologias específicas para os diferentes compostos fenólicos. Desta forma, este trabalho teve como objetivo adaptar um método cromatográfico para detecção e quantificação de punicalagina em romã.

Metodologia utilizada

Processamento da matéria-prima

Os frutos de romã (*Punica granatum* L.) foram fornecidos pela fazenda Boa Fruta, localizada em Petrolina/PE. Os frutos foram higienizados com água potável. Cada fruto foi cortado em quatro partes, sendo os arilos separados das cascas (semente e polpa).

As cascas foram fatiadas com faca no sentido longitudinal em dimensões aproximadas de 1 cm, colocadas em uma bandeja e levadas a um secador de cabine para desidratar a 40°C por 24 horas. As cascas desidratadas foram trituradas e posteriormente acondicionadas em embalagens de alumínio e polietileno (*stand up pouch*), seladas a vácuo e mantidas a 7 °C até o momento das determinações analíticas.

Extração da amostra

A etapa de extração foi feita segundo metodologia descrita por Kim e Lee (2002). O extrato foi obtido a partir de 1 g da casca desidratada de romã, com uma solução de metanol 80% em água, sendo a amostra submetida em seguida a etapas de sonificação e centrifugação. Repetiu-se três vezes a lavagem da amostra com a solução.

Método cromatográfico

Para a análise cromatográfica, foram realizadas adaptações na metodologia descrita por Luque-Rodríguez et al. (2007), tendo sido modificadas as dimensões da coluna e o gradiente de eluição. Estes autores utilizam para a identificação de alguns compostos fenólicos, não incluindo a punicalagina, uma coluna C₁₈ com dimensões 250 mm x 4,6 mm; 5 µm. Neste trabalho, visando à caracterização da punicalagina, esta coluna foi substituída pela coluna Thermo® Scientific C₁₈ BDS (100 mm x 4,6 mm; 2,4 µm) com temperatura do forno a 40°C, em um cromatógrafo líquido de alta eficiência da Waters modelo Alliance® 2690/5 com detector de arranjo de diodos (DAD), volume de injeção de 1 µL, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e leituras no comprimento de onda de 260 nm. A fase móvel foi eluída em modo gradiente composta por soluções de acetonitrila (solução A) e de ácido fórmico a 1% em água (solução B), conforme descrito a seguir: 0-5 min, 97-95%B; 5-10 min, 95-85%B; 10-16 min, 85-70%B; 16-18 min, 70-97%B; 18-25 min, 97%B.

A quantificação do composto foi realizada por padronização externa, a partir da construção de curva analítica com o padrão de punicalagina (mistura de isômeros) da marca Sigma-Aldrich®, disponível comercialmente.

Resultados

A substituição da coluna cromatográfica por uma de menor comprimento e com partículas de diâmetro reduzido (2,4 µm) permitiu a redução do tempo da corrida cromatográfica, além da redução de resíduo gerado.

A identificação da punicalagina nas amostras analisadas foi realizada através da comparação dos tempos de retenção e dos espectros de absorção UV/Visível do padrão comercial (Figura 2) e do extrato da casca de romã (Figura 3), além da comparação com dados da literatura, como os estudos realizados por Gil et al. (2000) e Çam e Hişil (2010).

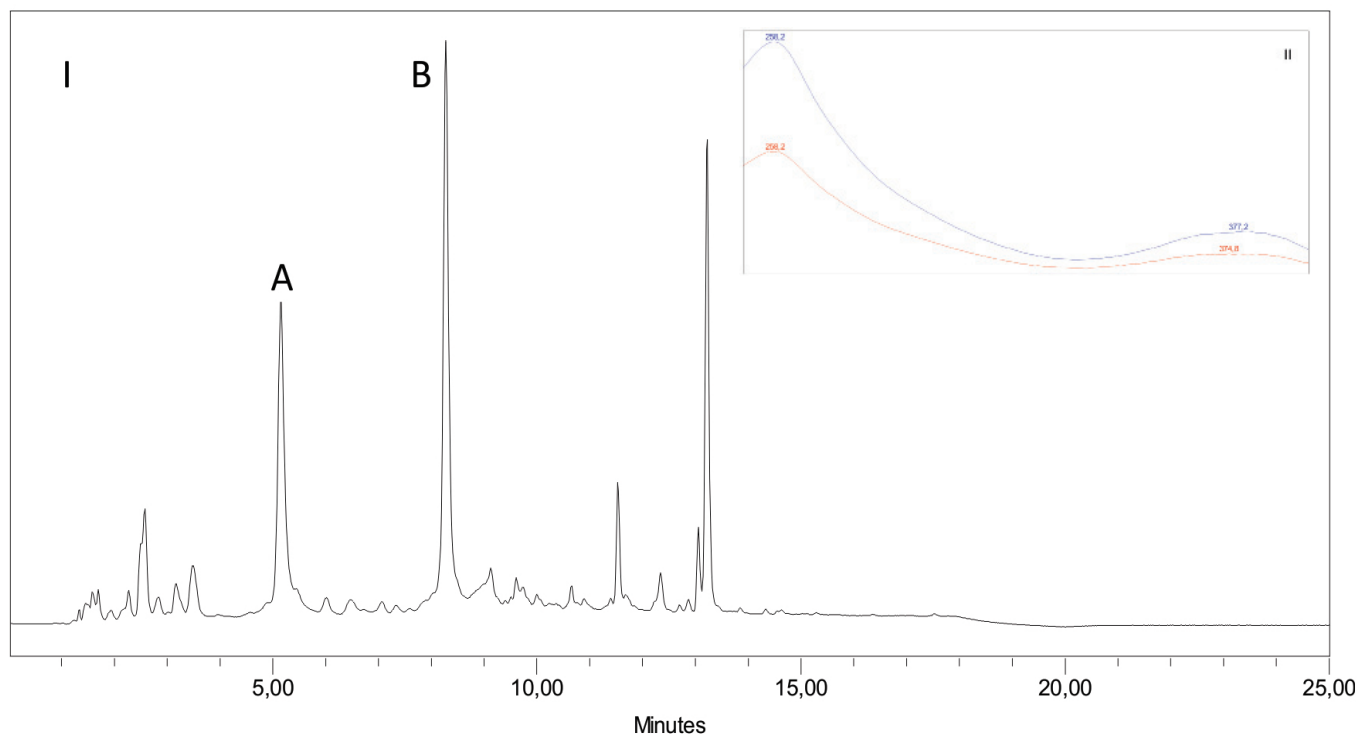


Figura 2. I: Cromatograma obtido do extrato na casca de romã a 260 nm (picos A e B: isômeros da punicalagina). II: Espectro de absorção UV/Visível a 260 nm (em vermelho: espectro do pico A; em azul: espectro do pico B).

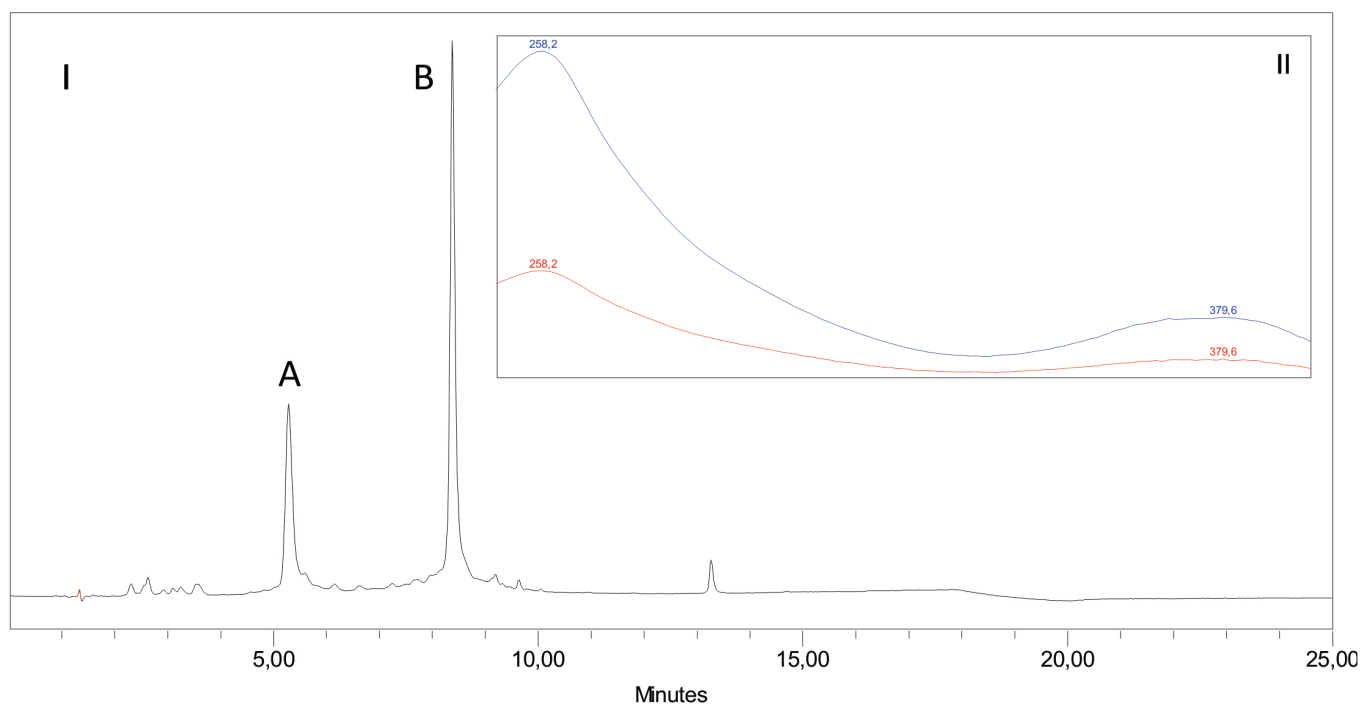


Figura 3. I: Cromatograma obtido do padrão comercial de punicalagina (picos A e B: isômeros da punicalagina). II: Espectro de absorção UV/Visível a 260 nm (em vermelho: espectro do pico A; em azul: espectro do pico B).

Gil et al. (2000), dentre os diversos compostos fenólicos presentes na casca de romã, encontraram resultados semelhantes, identificando os isômeros da punicalagina.

A partir da curva analítica construída com o padrão comercial na faixa de trabalho igual a 0,05 a 0,80 mg.mL⁻¹, foi possível quantificar as concentrações de punicalagina na casca de romã liofilizada, conforme descrito na Tabela 1.

Çam e Hişil (2010) encontraram uma concentração total de punicalagina igual a 11,66 g.100g⁻¹ na casca de romã, próximo ao valor encontrado no presente trabalho.

Os resultados obtidos mostraram que o método adaptado mostrou-se satisfatório para análise de identificação e quantificação por CLAE da punicalagina em amostras de casca de romã.

Tabela 1. Concentração de punicalagina na casca desidratada de romã

Amostra	Punicalagina (Pico A) (g.100g ⁻¹)	Punicalagina (Pico B) (g.100g ⁻¹)	Punicalagina Total (Picos A+B) (g.100g ⁻¹)
Casca de romã desidratada	3,01	7,00	10,01

Valores referentes à média de duplicatas.

Referências

ÇAM, M.; HIŞIL, Y. Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 878-885, Dec. 2010.

FISCHER, U. A.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 807-821, Jul. 2011.

GIL, M. I.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; HESS-PIERCE, B.; HOLCROFT, D. M.; KADER, A. A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 10, p. 4581-4589, Oct. 2000.

GONÇALVES, A. E. de S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C**. 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GONZÁLEZ-MOLINA, E.; MORENO, D. A.; GARCÍA-VIGUERA, C. A new drink rich in bioactives combining lemon and pomegranate juices. **Food Chemistry**, Barking, v. 115, n. 4, p. 1364-1372, Aug. 2009.

KIM, D. O.; LEE, C. Y. Extraction and Isolation of polyphenolics. In: WROLSTAD, R. E. (Ed.). **Current protocols in food analytical chemistry**. New York: Wiley, 2002. Ref. I1.2.1, I1.2.2.

LANSKY, E. P.; NEWMAN, R. A. Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 177-206, Jan. 2007.

LUQUE-RODRIGUEZ, J. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D.; PÉREZ-JUAN, P. Dynamic superheated liquid extraction of anthocyanins and other phenolics from red grape skins of winemaking residues. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 14, p. 2705-2713, Oct. 2007.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extractions and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, Oct. 2004.

SINGH, R. P.; CHIDAMBARA MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA, G. K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 81-86, Jan. 2002.

SUMNER, M. D.; ELLIOTT-ELLER, M.; WEIDNER, G.; DAUBENMIER, J. J.; CHEW, M. H.; MARLIN, R.; RAISIN, C. J.; ORNISH, D. Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease. **The American Journal of Cardiology**, v. 96, n. 6, p. 810-814, Sept. 2005.

Comunicado Técnico, 204

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na: **Embrapa Agroindústria de Alimentos**

Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba 23020-470 - Rio de Janeiro - RJ

Fone: (21) 3622-9600 / **Fax:** (21) 3622-9713

Home Page: www.embrapa.br/agroindustria-de-alimentos

SAC: www.embrapa.br/fale-conosco

1ª edição

1ª impressão (2014): tiragem (50 exemplares)

Comitê de Publicações

Presidente: Virgínia Martins da Matta

Membros: Ana Iraidy Santa Brígida, André Luis do Nascimento Gomes, Celma Rivanda Machado de Araujo, Daniela de Grandi Castro Freitas de Sá, Leda Maria Fortes Gottschalk, Luciana Sampaio de Araújo, Renata Torrezan e Rogério Germani

Expediente

Supervisão editorial: Daniela de Grandi C. F. de Sá

Revisão de texto: Janine Passos Lima Da Silva

Normalização bibliográfica: Luciana S. de Araújo

Editoração eletrônica: André Luis do N. Gomes e Marcos Moulin